



# 花椒窄吉丁触角转录组及嗅觉相关基因分析

巩雪芳, 谢寿安\*, 杨平, 郭莉, 陈迪, 车显荣, 王延来, 吕淑杰

(西北农林科技大学林学院, 陕西杨陵 712100)

**摘要:**【目的】建立花椒窄吉丁 *Agrilus zanthoxylumi* 成虫触角转录组数据库, 挖掘嗅觉相关基因, 为今后研究其触角的化学感受机制及生物防控提供理论支撑。【方法】采用高通量测序平台 Illumina NovaSeq 6000 对花椒窄吉丁雌雄成虫触角进行转录组测序, 用 Trinity 软件对获得的高质量 reads 进行序列拼接与组装; 使用 BLAST 软件将触角转录组数据比对 NR, NT, Swiss-Prot, GO, KEGG, BLASTX, eggNOG, Pfam, TmHMM, SignalP, KO, Map, BLASTP 和 RNAMMER 公共数据库; 基于初步筛选到的花椒窄吉丁候选气味结合蛋白 (odorant binding protein, OBP) 和化学感受蛋白 (chemosensory protein, CSP) 以及其他鞘翅目昆虫的同源蛋白的核苷酸序列, 利用 MEGA 软件进行系统进化分析。运用 RPKM (reads per kilobase per million mapped reads) 值对嗅觉相关基因表达量进行分析。【结果】花椒窄吉丁雌雄成虫触角转录组测序共获得 36 209 条基因和 90 982 条转录本, 其 N50 分别为 2 103 和 2 523 bp, 组装完整性较高。注释到 NR 数据库的基因最多 (41.62%), 其中与赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 相似基因所占比例最高 (19%)。在 GO 数据库中比对到 11 614 个基因, 按功能分为细胞组分、分子功能与生物学进程三大类 57 个分支, 其中分子功能大类中的结合 (70.57%) 与催化活性 (45.51%) 相关基因占比最多; KEGG 代谢途径分析表明, 7 427 条基因参与了 5 类代谢通路, 其中涉及信号转导的基因最多, 为 815 条; 筛选到 7 个候选 OBP 基因和 5 个具有全长开放阅读框的 CSP 基因, 其编码蛋白均具有化学感受蛋白家族的典型特征。系统进化分析表明, 花椒窄吉丁 OBPs 和 CSPs 分别与苹果小吉丁 *A. mali* 的 OBPs 和 CSPs 氨基酸序列一致性最高。RPKM 值表明, 嗅觉相关基因 *AzanOBP1* 和 *AzanOBP2* 在雌成虫触角中不表达, 在雄成虫触角中微量表达; *AzanOBP3* 在雄成虫触角中高丰度表达。【结论】首次获得了花椒窄吉丁成虫触角转录组数据, 筛选到了花椒窄吉丁 OBP, CSP, Or, IR 和 SNMP 等的嗅觉相关基因。推测触角中高丰度表达的 OBPs 对雄成虫识别同类异性释放的信息素或寄主植物释放的挥发物起关键作用。研究结果可为花椒窄吉丁化学感受基因功能分析及嗅觉感受机制研究奠定分子基础。

**关键词:** 花椒窄吉丁; 触角转录组; 基因注释; 气味结合蛋白; 化学感受蛋白

**中图分类号:** S763.38      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0454-6296(2020)10-1159-12

## Analysis of the antennal transcriptome and olfaction-related genes of *Agrilus zanthoxylumi* (Coleoptera: Buprestidae)

GONG Xue-Fang, XIE Shou-An\*, YANG Ping, GUO Li, CHEN Di, CHE Xian-Rong, WANG Yan-Lai, LÜ Shu-Jie (College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** 【Aim】To establish the antennal transcriptome database of *Agrilus zanthoxylumi* adult and to explore target genes related to olfaction, so as to provide the theoretical basis for the future study of the chemosensory mechanism of its antenna and its biological control. 【Methods】High-throughput sequencing platform Illumina NovaSeq 6000 was used for transcriptome sequencing of the antennae of

基金项目: 国家公益性行业(林业)项目(201504324); 云南省林业科技推广示范项目“花椒主要病虫害绿色防控技术推广与应用示范”(云[2019]TG01号); 陕西省第二批特支计划领军人才项目

作者简介: 巩雪芳, 女, 1993年9月生, 甘肃天水人, 硕士研究生, 研究方向为森林昆虫学, E-mail: 244315334@qq.com

\* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: shouanxie@163.com

收稿日期 Received: 2020-02-14; 接受日期 Accepted: 2020-07-17

female and male adults of *A. zanthoxylumi*. Trinity software was used for sequence splicing and assembly of the high-quality reads obtained. BLAST software was used to compare the antennal transcriptome data with public databases NR, NT, Swiss-Prot, GO, KEGG, BLASTX, eggNOG, Pfam, TmHMM, SignalP, KO, Map, BLASTP and RNAME. Phylogenetic analysis was carried out using MEGA software based on the nucleotide sequences of the preliminarily screened candidate odorant binding proteins (OBPs) and chemosensory proteins (CSPs) of *A. zanthoxylumi*, and homologous proteins from other coleopteran insects. The RPKM (reads per kilobase per million mapped reads) value was used to evaluate the expression levels of olfaction-related genes. 【Results】 By sequencing of the antennal transcriptome of female and male adults of *A. zanthoxylumi*, a total of 36 209 unigenes and 90 982 transcripts were obtained with the N50 of 2 103 and 2 523 bp, respectively, indicating the high completeness of assembly. Most unigenes (41.62%) were annotated to the NR database, with the highest proportion (19%) of genes similar to those of *Tribolium castaneum*. In the GO database, 11 614 unigenes were annotated and divided into 57 branches of three functional categories, cellular component, molecular function and biological process, among which binding (70.57%) and catalytic activity (45.51%) related unigenes in the category of molecular function were the most. The KEGG metabolic pathway analysis indicated that 7 427 unigenes are involved in five categories of metabolic pathways, with the most unigenes (815) involved in signal transduction. Seven candidate OBP genes and 5 CSP genes with full-length open reading frame were screened, and their encoded proteins have the typical characteristics of chemosensory protein family. The phylogenetic analysis showed that the OBPs and CSPs of *A. zanthoxylumi* have the highest sequence identity with the OBPs and CSPs of *A. mali*, respectively. The RPKM values showed that *AzanOBP1* and *AzanOBP2* were not expressed in the antennae of female adults, but slightly expressed in the antennae of male adults, and *AzanOBP3* was expressed with high abundance in the antennae of male adults. 【Conclusion】 For the first time, the antennal transcriptome data of *A. zanthoxylumi* were obtained, and the olfaction-related OBP, CSP, OR, IR and SNMP genes of *A. zanthoxylumi* were screened. It is speculated that OBPs expressed with high abundance in the antennae play a key role in identifying pheromones released by female adults of the same species or the volatiles released by host plants. The results can lay a molecular basis for further studying the functions of chemosensory genes and olfactory sensitivity mechanism of *A. zanthoxylumi*.

**Key words:** *Agrilus zanthoxylumi*; antennal transcriptome; gene annotation; odorant binding protein; chemosensory protein

花椒窄吉丁 *Agrilus zanthoxylumi* 属鞘翅目 (Coleoptera) 吉丁科 (Buprestidae) 窄吉丁属 *Agrilus*, 是我国花椒林中最主要的毁灭性蛀干害虫 (吴海, 2006; 权丽君, 2016)。1987 年在陕西省韩城市椒园首次发现花椒窄吉丁是致使花椒大量死亡的主要原因 (薛耀宗, 1989)。目前, 主要分布于陕西、甘肃、山东、山西等地 (党国刚等, 2017)。幼虫主要蛀食枝干形成层, 引起树势衰弱, 产量品质下降 (李辉, 2013), 主要危害特征是受害部位虫疤松软湿润, 有无色或淡褐色液体渗出, 俗称“流油” (焦浩, 2011)。成虫取食叶片补充营养, 造成叶片的缺刻、空洞, 树皮流胶、软化、腐烂、干枯、龟裂最后脱落至整株死亡 (杜平, 2012; 王燕等, 2012)。花椒窄吉

丁的研究主要集中于虫情调查、种群动态、发生规律 (李孟楼等, 1990) 及其化学防治 (康克功等, 2007) 等方面。近年来, 在花椒窄吉丁与寄主植物互作的分子机制方面, 对寄主挥发物、后肠与粪便提取物对其引诱和驱避作用进行了初步研究 (袁丽芳等, 2016; 刘绥鹏等, 2017); 对花椒窄吉丁雌、雄成虫触角差异表达基因的进行了筛选 (巩雪芳等, 2019); 对气味结合蛋白基因 *AzanOBP3* 的克隆、原核表达及组织表达谱分析也进行了初探 (巩雪芳等, 2020), 但是对其作用的分子靶标尚不清楚。触角是昆虫感受外界信号的主要器官, 在长期进化过程中形成了能够感知各种化学信息物的高度灵敏且特异的嗅觉感受系统 (王桂荣等, 2002; 修

伟明等, 2005; 游灵等, 2012; Brito *et al.*, 2016), 在定位寄主、寻求配偶、觅食或产卵等种群生存及繁衍过程中均发挥重要作用 (Zhang *et al.*, 2015)。嗅觉识别过程需要多种蛋白的参与, 主要有气味结合蛋白 (odorant binding proteins, OBPs)、化学感受蛋白 (chemosensory proteins, CSPs)、气味受体 (odorant receptors, ORs)、离子型受体 (ionotropic receptors, IRs)、感受神经元膜蛋白 (sensory neuron membrane proteins, SNMPs)、气味降解酶 (odorant-degrading enzymes, ODEs) 等 (詹文会, 2018)。昆虫感受器淋巴液内发现两类作为环境信息分子结合载体的水溶性蛋白, 即气味结合蛋白和化学感受蛋白 (Angeli *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2011)。

花椒窄吉丁是如何感知寄主气味物质并准确定位到唯一的寄主植物, 在寻找寄主过程中嗅觉是如何发挥作用的? 深入研究花椒窄吉丁嗅觉系统有助于阐明其定位寄主及寻找配偶时识别信息物质及其化学通讯与感受机制, 而获得大量嗅觉相关基因是进行分子机制研究的前提。为此, 本研究借助高通量测序对花椒窄吉丁成虫触角转录组进行生物信息学分析, 获得了参与嗅觉感受的一些重要化学感受基因 OBP, CSP, OR, IR 和 SNMP 家族基因, 为今后花椒窄吉丁嗅觉感受蛋白的作用机制提供理论支撑, 对开展害虫行为调控剂的筛选及绿色防控技术研究具有重要的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试昆虫

2018 年 5–7 月于陕西省蓝田县普化镇花椒园采集花椒窄吉丁成虫后带回实验室于 25℃ 下饲养。选取 1 000 头活动能力较强的成虫, 用灭菌三蒸水冲洗虫体表面, 70% 的酒精表面消毒 30 s, 灭菌三蒸水冲洗虫体 2 次后解剖镜下于冰上迅速切下触角雌雄分开收集, 液氮冷冻保存于 -80℃ 备用。

### 1.2 雌雄成虫触角总 RNA 的提取与质量检测

采用 Trizol 法分别提取花椒窄吉丁雌、雄成虫触角总 RNA。利用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳和凯奥 K5500 分光光度计检测 RNA 纯度 ( $OD_{260}/OD_{280}$  比值), 安捷伦 2100 RNA Nano 6000 Assay Kit 检测完整性和浓度, 质量合格的 RNA 样品保存于 -80℃ 备用或者立即进行反转录。

### 1.3 文库构建与测序

1.2 节样品 RNA 质量及纯度经检测合格后, 用

带有 Oligo (dT) 的磁珠富集 mRNA, 加入片段缓冲液到 mRNA 中使其片段化成为短片段, 以片段后的 mRNA 为模板, 用六碱基随机引物合成 cDNA 第 1 链, 并加入缓冲液、dNTPs、RNaseH 和 DNA Polymerase I 继续合成 cDNA 第 2 链, 采用 QIA Quick PCR 试剂盒纯化并加 EB 缓冲液洗脱。对洗脱纯化后得到的双链 cDNA 再进行末端修复、加碱基 A、加测序接头处理, 回收目的大小片段进行 PCR 扩增。在获得 clean reads 后需采用 Trinity 软件对 clean reads 拼接和组装, 获取分析所需的参考序列。转录本具有可变剪接的特点, 组装出全长转录本, 对测序得到的原始数据 (raw data) 过滤, 获得高质量的数据 (clean data), 在所有的转录本中, 取最长的 contigs 作为 unigenes。

### 1.4 转录组数据分析

高通量测序中, Q20 值是指测序时碱基识别过程中, 对所识别的碱基给出的错误概率, 错误识别概率是 1%, 正确率 99%; 质量值 Q30, 错误识别概率 0.1%, 正确率 99.9%; N50 即覆盖 50% 核苷酸的最大 unigene 长度或最大序列重叠群长度。unigenes 序列与 NR, NT, Swiss-Prot, GO, KEGG, BLASTX, eggNOG, Pfam, TmHMM, SignalP, KO, Map, BLASTP 和 RNAMMER 公共数据库比对, 对获得的所有 unigenes 进行功能注释及结果统计。

### 1.5 嗅觉相关基因的鉴定与序列分析

BLAST 同源搜索从触角转录组中鉴定 OBPs, CSPs, Ors, IRs 和 SNMPs 嗅觉相关基因。从 NCBI 数据库中下载苹果小吉丁 *A. mali* 和白蜡窄吉丁 *A. planipennis* 等其他鞘翅目昆虫的嗅觉相关基因核酸序列, 采用 ClustalX 进行多序列比对, 利用 MEGA 软件邻接法 (neighbour-joining method, NJ method) 构建系统发育树, 对结果进行 1 000 次 bootstrap 验证。

### 1.6 嗅觉相关基因的表达分析

衡量基因表达量时, 单纯以 map 到的 read 数计算基因的表达量, 统计上是不合理的。本研究利用每百万条 reads 中来自于某基因每千碱基长度的 reads 数 (reads per kilobase per million mapped reads, RPKM) (Mortazavi *et al.*, 2008), 对嗅觉相关基因表达量进行分析。

## 2 结果

### 2.1 测序结果及从头组装

花椒窄吉丁雌雄成虫触角转录组数据 (SUB6796283) 经过滤后分别获得 43 124 393 和 45 854 648 条 clean read, 组装得到 36 209 条基因和

90 982 条转录本,转录本和基因的 N50 分别为2 523 和 2 103 bp (图 1)。样品 clean data 均达到 96% 以上,Q20 均为 100% ,Q30 均不少于 92% ,组装完整性较高(表 1)。

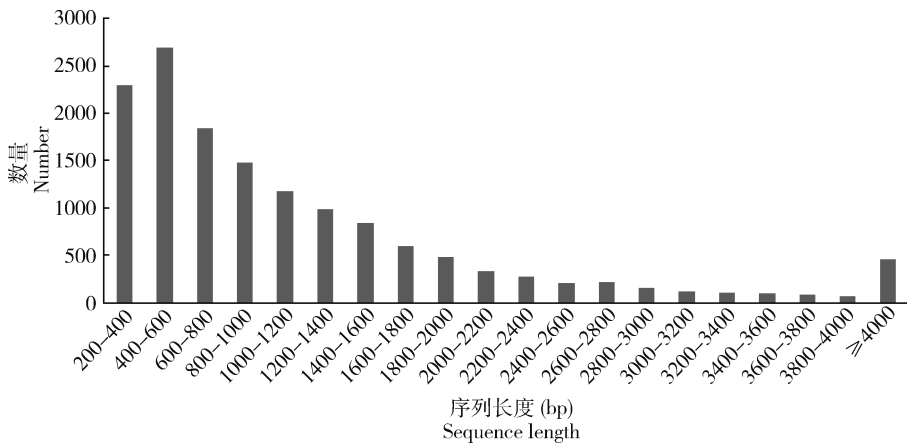


图 1 花椒窄吉丁雌雄成虫触角转录组 unigenes 长度分布

Fig. 1 Length distribution of unigenes in the antennal transcriptome of female and male adults of *Agrilus zanthoxylumi*

| 表 1 花椒窄吉丁雌雄成虫触角转录组组装结果统计                                                                                            |        |                       |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|-----------------------|-----------|
| Table 1 Summary of assembly for the antennal transcriptome of female and male adults of <i>Agrilus zanthoxylumi</i> |        |                       |           |
|                                                                                                                     | 数量     | 碱基总数                  | (G + C) % |
|                                                                                                                     | Number | Total number of bases |           |
| 转录本 Transcripts                                                                                                     | 90 982 | 66 565 475            | 39.18     |
| 基因 Unigenes                                                                                                         | 36 209 | 183 683 635           | 37.63     |

2.2 基因功能注释

使用 BLAST 软件将获得的花椒窄吉丁雌雄成虫触角转录组 unigenes 序列与 NR, Swiss-Prot, GO, BLASTX 和 BLASTP 等公共数据库比对(表 2), 并对

| 表 2 花椒窄吉丁雌雄成虫触角转录组基因功能注释结果统计                                                                                                          |                    |            |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|------------|
| Table 2 Statistics of gene function annotation in the antennal transcriptome of female and male adults of <i>Agrilus zanthoxylumi</i> |                    |            |
| 数据库                                                                                                                                   | Unigene 数量         | 占比(%)      |
| Database                                                                                                                              | Number of unigenes | Proportion |

|            |        |       |
|------------|--------|-------|
| NR         | 15 070 | 41.62 |
| NT         | 3 692  | 10.19 |
| Swiss-Prot | 12 508 | 34.54 |
| GO         | 11 614 | 32.08 |
| BLASTX     | 11 676 | 32.25 |
| eggNOG     | 8 766  | 24.21 |
| Pfam       | 9 428  | 26.04 |
| TmHMM      | 2 500  | 6.90  |
| SignalP    | 1 301  | 3.59  |
| KO         | 6 550  | 18.09 |
| Map        | 4 025  | 11.12 |
| BLASTP     | 9 458  | 26.12 |
| RNAMMER    | 14     | 0.04  |

注释结果做比较韦恩图(图 2), 共有 36 209 条 unigenes 得到注释,其中包括 29 927 条(54.21%)雌成虫触角的和 26 706 条(50.78%)雄成虫触角的。NR 数据库注释到的 unigene 最多(15 070 条, 41.62%), 同时注释到 NT, NR, BLASTX 和 BLASTP 四大数据库的有 2 682 条。同源蛋白的物种来源分析结果表明,与赤拟谷盗的相似基因最多(19%)(图 3)。

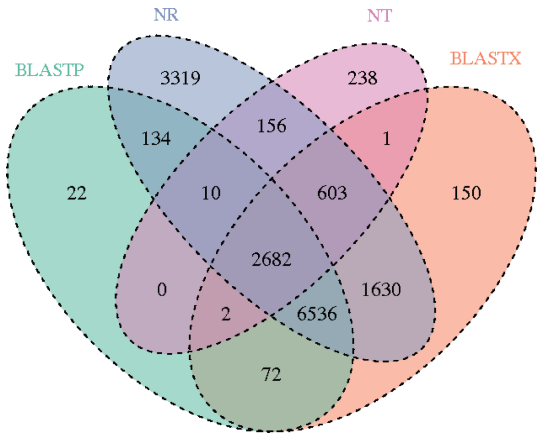


图 2 花椒窄吉丁雌雄成虫触角转录组基因功能注释结果韦恩图

Fig. 2 Venn diagram of gene annotation results of the antennal transcriptome of female and male adults of *Agrilus zanthoxylumi*

2.3 GO 功能分类

GO 功能分类统计(图 4)表明,比对到 11 614 条 unigenes,分为细胞组分( cellular component)、分子功能( molecular function)与生物学进程( biological process)三大类共 57 个分支。其中,生物学进程大

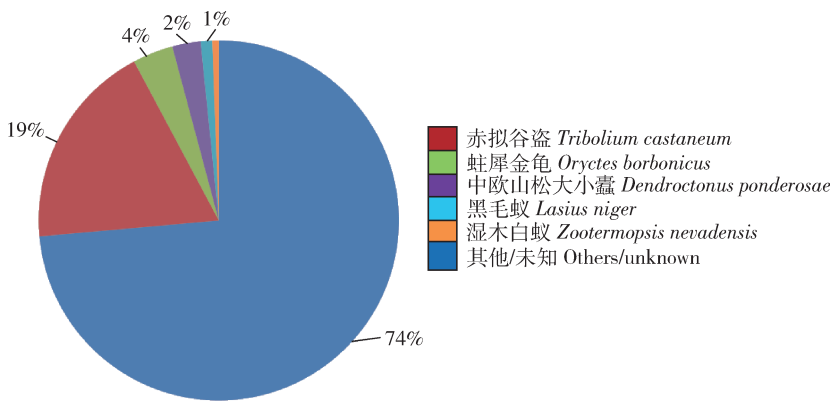


图3 NR数据库中注释的花椒窄吉丁雌雄成虫触角 unigenes 的物种分布

Fig. 3 Species distribution of unigenes in the antennal transcriptome of female and male adults of *Agrilus zanthoxylum* annotated in the NR database

类中参与细胞进程 (cellular process) 基因最多 (72.55%), 其次是代谢进程 (metabolic process) (58.15%)、生物学调控 (biological regulation) (42.91%), 其余均在 40% 以下; 细胞组分大类中细胞部分 (cell part) 基因最多 (78.54%), 其次是细胞器 (organelle) (49.19%)、细胞器部分 (organelle part) (40.69%)、膜 (membrane) (30.48%) 与膜部分 (membrane part) (27.00%)、大分子复合物 (macromolecular complex) (26.47%), 其余均低于 10%; 分子功能大类中结合 (binding) (70.57%) 与催化活性 (catalytic activity) (45.51%) 的基因最多, 其余均在 10% 以下。

2.4 KEGG 代谢通路分析

通过整合数据库, 分析 unigenes 可能参与或涉及的代谢途径的注释结果 (图 5) 发现有 7 427 条 unigenes 参与了 5 类代谢通路: 细胞进程 (cellular process), 环境信息处理 (environmental information processing), 遗传信息处理 (genetic information processing), 新陈代谢 (metabolism) 和有机系统 (organismal system)。其中 unigenes 注释最多的代谢通路为信号转导 (signal transduction) (815 条), 翻译 (translation) (586 条), 内分泌系统 (endocrine system) (466 条), 运输和分解代谢 (transport and catabolism) (440 条), 折叠、分拣和降解 (folding, sorting and degradation) (417 条), 碳水化合物代谢 (carbohydrate metabolism) (397 条)。

2.5 嗅觉相关基因的筛选及进化分析

初步鉴定到 7 个 OBP 基因 (*AzanOBP1* - 7), 其中只有 5 个 OBP 基因具有全长开放阅读框, *AzanOBP1*, *AzanOBP2*, *AzanOBP3*, *AzanOBP4* 和 *AzanOBP5* 具有 6 个保守的半胱氨酸位点, 符合气味

结合蛋白的特征 (Cys-X15-39-Cys-X3-Cys-X21-44-Cys-X7-12-Cys-X8-Cys, X 代表任意一种氨基酸), 为典型的 OBP。5 个具有全长开放阅读框的 CSP 基因 (*AzanCSP1* - 5), 3 个 OR 基因 (*AzanOR1* - 3), 5 个 IR 基因 (*AzanIR1* - 5) 和 5 个 SNMP 基因 (*AzanSNMP1* - 5)。基于 *AzanOBP* 和 *AzanCSP* 基因以及其他类群昆虫 OBP 和 CSP 基因核苷酸序列构建系统发育树, 发现花椒窄吉丁的 7 个 OBP 基因分支聚类较为分散 (图 6), 但都至少与一个鞘翅目昆虫的 OBP 同源基因聚类在一支, 且序列一致性很高。*AzanOBP1* 和 *AzanOBP3* 的序列一致性较高, 且分别与白蜡窄吉丁 *Agrilus planipennis* *AplaGOBP83a* (GenBank 登录号: XM\_025974145.1) 和苹果小吉丁 *Agrilus mali* *AmalOBP2* (GenBank 登录号: MF615491.1) 聚到一支; *AzanOBP2* 和 *AzanOBP4* 均与苹果小吉丁的 *AmalOBP3* (GenBank 登录号: MF615492.1) 亲缘关系近, 三者聚到同一支。

花椒窄吉丁 5 个 CSP 基因聚类较为集中 (图 7); *AzanCSP1*, *AzanCSP2* 和 *AzanCSP3* 聚集到同一分支, 5 个 CSP 基因均与苹果小吉丁的 *AmalCSP* 亲缘关系最近。对于鞘翅目其他不同种的昆虫的 CSP 基因, 也出现一定的聚类关系分别在进化树中形成多个独立的小分支; 同一种昆虫的不同 CSP 基因聚类关系较分散也形成了多个独立的小分支。

2.6 嗅觉相关基因的表达量

利用 RPKM 值评估不同嗅觉相关基因在雌雄成虫触角中的表达量, 结果表明 (图 8), *AzanOBP1* 和 *AzanOBP2* 在雌成虫触角中不表达, 在雄成虫触角中微量表达; *AzanOBP3* 在雄成虫触角中高丰度表达 (RPKM > 1 000), 在雌成虫触角中中量表达。*AzanOBP4* 在雄成虫触角中中量表达 (RPKM >

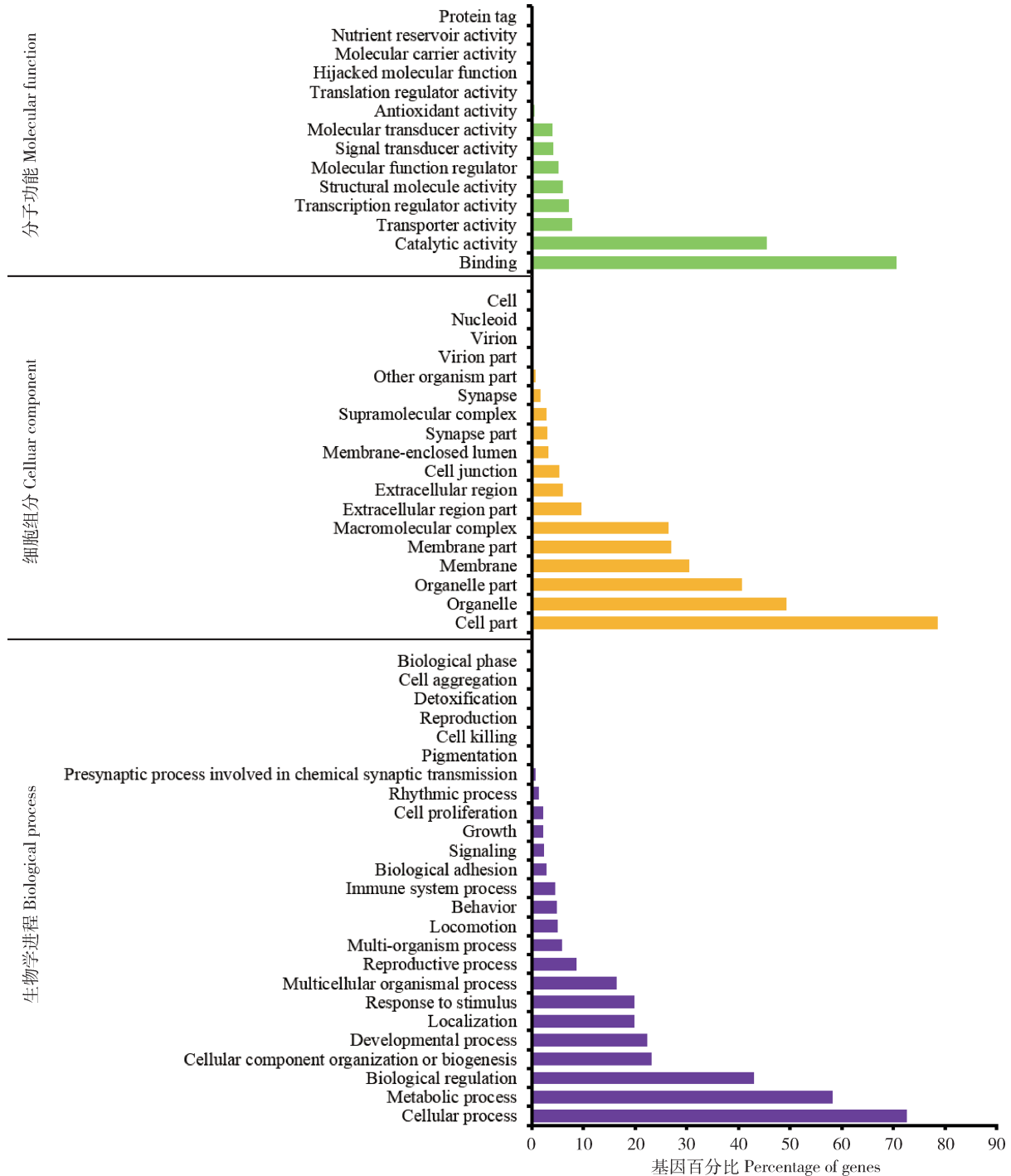


图 4 花椒窄吉丁雌雄成虫触角 unigenes 的 GO 分类  
Fig. 4 GO classification of unigenes of female and male antennae of *Agrilus zanthoxylumi*

400), *AzanOBP* 基因在雄成虫触角中的表达量排序为: *AzanOBP3* (RPKM = 1 160. 57) > *AzanOBP4* (RPKM = 244. 93) > *AzanOBP6* (RPKM = 145. 09) > *AzanOBP7* (RPKM = 44. 78) > *AzanOBP5* (RPKM = 42. 36) > *AzanOBP1* (RPKM = 2. 30) 和 *AzanOBP2* (RPKM = 1. 79), 在雌成虫触角中的表达量排序为: *AzanOBP3* (RPKM = 205. 25) > *AzanOBP6* (RPKM =

42. 94) > *AzanOBP4* (RPKM = 39. 69) > *AzanOBP7* (RPKM = 30. 66) > *AzanOBP5* (RPKM = 14. 04) > *AzanOBP1* (RPKM = 0) 和 *AzanOBP2* (RPKM = 0) (图 8: A)。除 *AzanCSP1* (RPKM > 200) 在雄成虫触角中中量表达外, 其他 *AzanCSP* 基因在雌雄成虫触角中表达量均较低 (RPKM < 200); *AzanCSP2* 在雌成虫触角中不表达 (RPKM = 0), 在雄成虫触角中微量

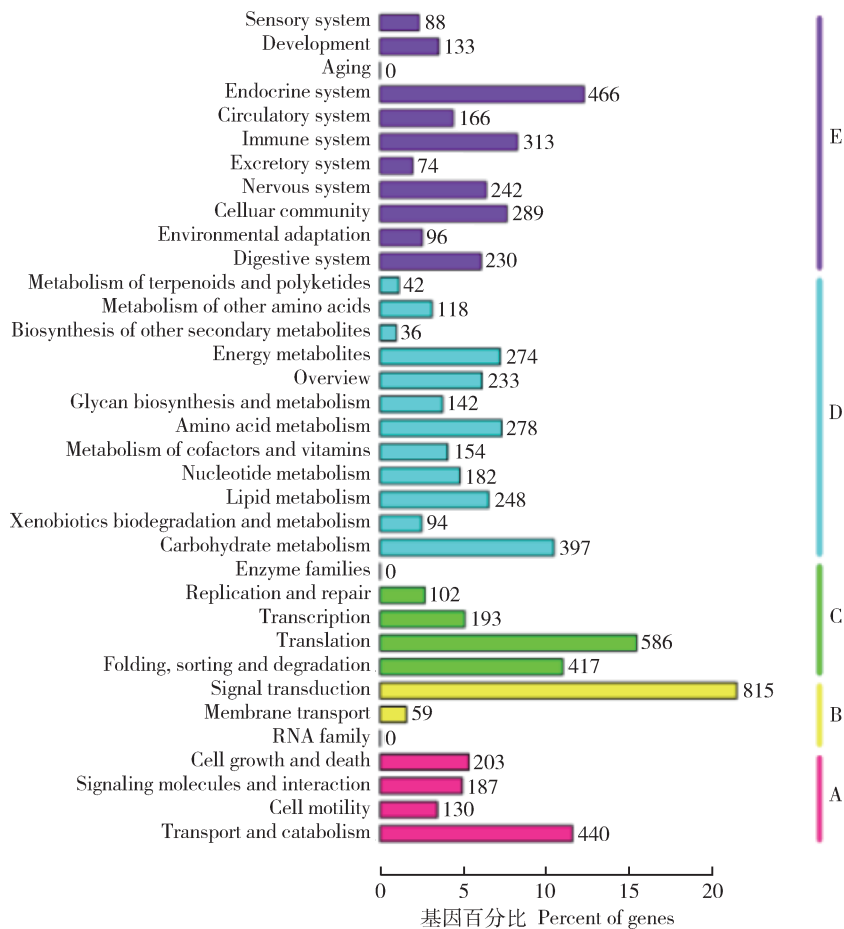


图5 花椒窄吉丁雌雄成虫触角 unigenes 的 KEGG 代谢通路

Fig. 5 KEGG metabolic pathways of the antennal unigenes of female and male adults of *Agrilus zanthoxylumi*  
A: 细胞进程 Cellular process; B: 遗传信息处理 Genetic information processing; C: 环境信息处理 Environmental information processing; D: 新陈代谢 Metabolism; E: 有机体系统 Organismal system.

表达(RPKM = 3.064) ; *AzanCSP* 基因在雄成虫触角中的表达量排序为: *AzanCSP1* ( RPKM = 302.16 > *AzanCSP5* ( RPKM = 64.58 ) > *AzanCSP4* ( RPKM = 32.07 ) > *AzanCSP3* ( RPKM = 8.64 ) > *AzanCSP2* ( RPKM = 3.06 ) , *AzanCSP* 基因在雌成虫触角中的表达量排序为: *AzanCSP1* ( RPKM = 207.85 ) > *AzanCSP5* ( RPKM = 79.65 ) > *AzanCSP4* ( RPKM = 27.21 ) > *AzanCSP3* ( RPKM = 4.24 ) > *AzanCSP2* ( RPKM = 0 ) ( 图 8: B ) 。 气味受体基因 *AzanOR* 基因在雌成虫触角中的表达量排序为: *AzanOR1* ( RPKM = 3.89 ) > *AzanOR2* ( RPKM = 0.28 ) > *AzanOR3* ( RPKM = 0.18 ) , *AzanOR* 基因在雄成虫触角中的表达量排序为: *AzanOR1* ( RPKM = 18.13 ) > *AzanOR3* ( RPKM = 2.81 ) > *AzanOR2* ( RPKM = 1.33 ) ( 图 8: C ) 。 离子型受体基因 *AzanIR* 基因在雌成虫触角中的表达量排序为: *AzanIR4* ( RPKM = 2.86 ) > *AzanIR2* ( RPKM = 1.89 ) > *AzanIR3* ( RPKM = 1.73 ) > *AzanIR1* ( RPKM = 0.95 ) > *AzanIR5* ( RPKM = 0.14 ) , 在

雄成虫触角中的表达量排序为: *AzanIR2* ( RPKM = 6.08 ) > *AzanIR4* ( RPKM = 4.21 ) > *AzanIR1* ( RPKM = 3.70 ) > *AzanIR3* ( RPKM = 2.08 ) > *AzanIR5* ( RPKM = 0.48 ) ( 图 8: D ) 。 神经元感受膜蛋白基因 *AzanSNMP5* 在雌成虫触角中不表达 ( RPKM = 0 ) , 在雄成虫触角中微量表达 ( RPKM = 0.24 ) , *AzanSNMP* 基因在雌成虫触角中的表达量排序为: *AzanSNMP2* ( RPKM = 19.90 ) > *AzanSNMP1* ( RPKM = 0.42 ) > *AzanSNMP3* ( RPKM = 0.05 ) > *AzanSNMP4* ( RPKM = 0.02 ) > *AzanSNMP5* ( RPKM = 0 ) , 在雄成虫触角中的表达量排序为: *AzanSNMP2* ( RPKM = 105.17 ) > *AzanSNMP4* ( RPKM = 0.46 ) > *AzanSNMP1* ( RPKM = 0.32 ) > *AzanSNMP5* ( RPKM = 0.24 ) > *AzanSNMP3* ( RPKM = 0.06 ) ( 图 8: E ) 。

3 讨论与结论

嗅觉相关基因的鉴定可为基于反向化学生态学

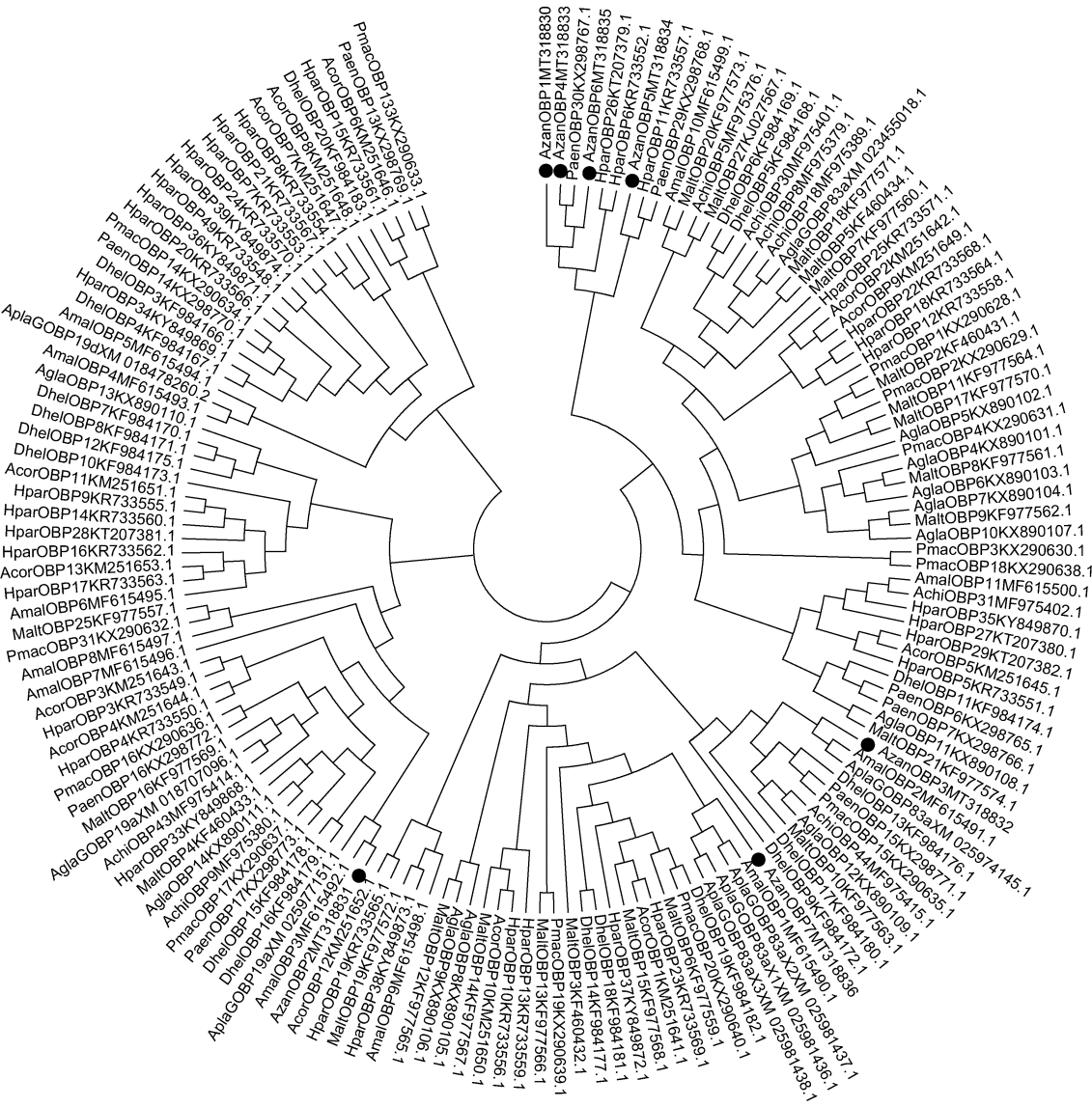


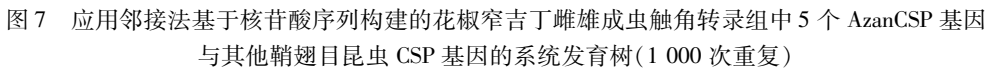
图6 应用邻接法基于核苷酸序列构建的花椒窄吉丁雌雄成虫触角转录组中7个 AzanOBP 基因与其他鞘翅目昆虫 OBP 基因的系统发育树(1 000 次重复)

Fig. 6 Phylogenetic tree of seven AzanOBP genes in the antennal transcriptome of female and male adults of *Agrilus zanthoxylumi* and OBP genes from other coleopteran insect species based on nucleotide sequences by using neighbor-joining method (1 000 replicates)

基因来源物种 Origin species of genes: AzanOBP: 花椒窄吉丁 *Agrilus zanthoxylumi*; AmalOBP: 苹果小吉丁 *Agrilus mali*; AplaOBP: 白蜡窄吉丁 *Agrilus planipennis*; DhelOBP: 花绒寄甲 *Dastarcus helophoroides*; HparOBP: 暗黑鳃金龟 *Holotrichia parallela*; PaenOBP: 榆绿毛蚶叶甲 *Pyrrhalta aenescens*; PmacOBP: 榆黄毛蚶叶甲 *Pyrrhalta maculicollis*; AcorOBP: 铜绿丽金龟 *Anomala corpulenta*; AchiOBP: 星天牛 *Anoplophora chinensis*; AglaOBP: 光肩星天牛 *Anoplophora glabripennis*; MaltOBP: 松墨天牛 *Monochamus alternatus*; TcasOBP: 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*; RdomOBP: 谷蠹 *Rhyzopertha dominica*; DarmOBP: 华山松大小蠹 *Dendroctonus armandi*.

的研究提供潜在分子靶标 (Zhu *et al.*, 2017), 利用昆虫行为调节剂和分子干扰技术调控昆虫个体间、昆虫与寄主间的化学通讯来防控害虫是国内外研究的热点 (杨海博等, 2018)。RNA-Seq 技术已成为转录组研究的重要手段, 成功运用于非模式昆虫功能基因挖掘 (郑海霞等, 2018), 为深入研究昆虫嗅觉相关基因功能奠定了坚实的基础。本研究对花椒窄

吉丁雌雄成虫触角转录组进行测序, 共获得 90 982 条转录本。GO 功能分类表明, 分子功能分类中参与结合的基因占比最多 (70.57%), 猜测花椒窄吉丁成虫触角中存在大量结合化学信息物质的蛋白。仍有 59% 的 unigenes 未被注释到公共数据库, 这些序列可能是一些非编码序列或者新发现的基因序列, 也可能是因为某些 unigene 长度过短并未能与



CSP 基因来源物种 Origin species of CSP genes: *AzanCSP*: 花椒窄吉丁 *Agrilus zanthoxylumi*; *AmalCSP*: 苹果小吉丁 *Agrilus mali*; *AplaCSP*: 白蜡窄吉丁 *Agrilus planipennis*; *TmolCSP*: 黄粉虫 *Tenebrio molitor*; *AchiOBP*: 星天牛 *Anoplophora chinensis*; *TcasCSP*: 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*; *RdomCSP*: 谷蠹 *Rhyzopertha dominica*; *DarmCSP*: 华山松大小蠹 *Dendroctonus armandi*; *DponCSP*: 中欧山松大小蠹 *Dendroctonus ponderosae*; *PmacCSP*: 榆黄毛萤叶甲 *Pyrrhalta maculicollis*; *PaenCSP*: 榆蓝叶甲 *Pyrrhalta aenescens*; *AglaCSP*: 光肩星天牛 *Anoplophora glabripennis*; *CbowCSP*: 大猿叶甲 *Colaphellus bowringi*; *MaltCSP*: 松墨天牛 *Monochamus alternatus*; *GdauCSP*: 沙葱萤叶甲 *Galeruca daurica*; *HparCSP*: 暗黑鳃金龟 *Holotrichia parallela*; *AcorCSP*: 铜绿丽金龟 *Anomala corpulenta*; *AgraCSP*: 棉铃象甲 *Anthonomus grandis*; *DhelCSP*: 花绒寄甲 *Dastarcus helophoroides*.

关联。KEGG 数据库对花椒窄吉丁成虫触角的 unigenes 可能参与或涉及的代谢途径的注释结果分析表明,花椒窄吉丁信号感受与传递的主要场所是触角。前期我们已经对雌雄成虫触角中这些靶标基因的表达差异进行了初步探讨(巩雪芳等, 2019)。本研究中 *AzanOBP3* 在触角中高丰度表达(图 8;

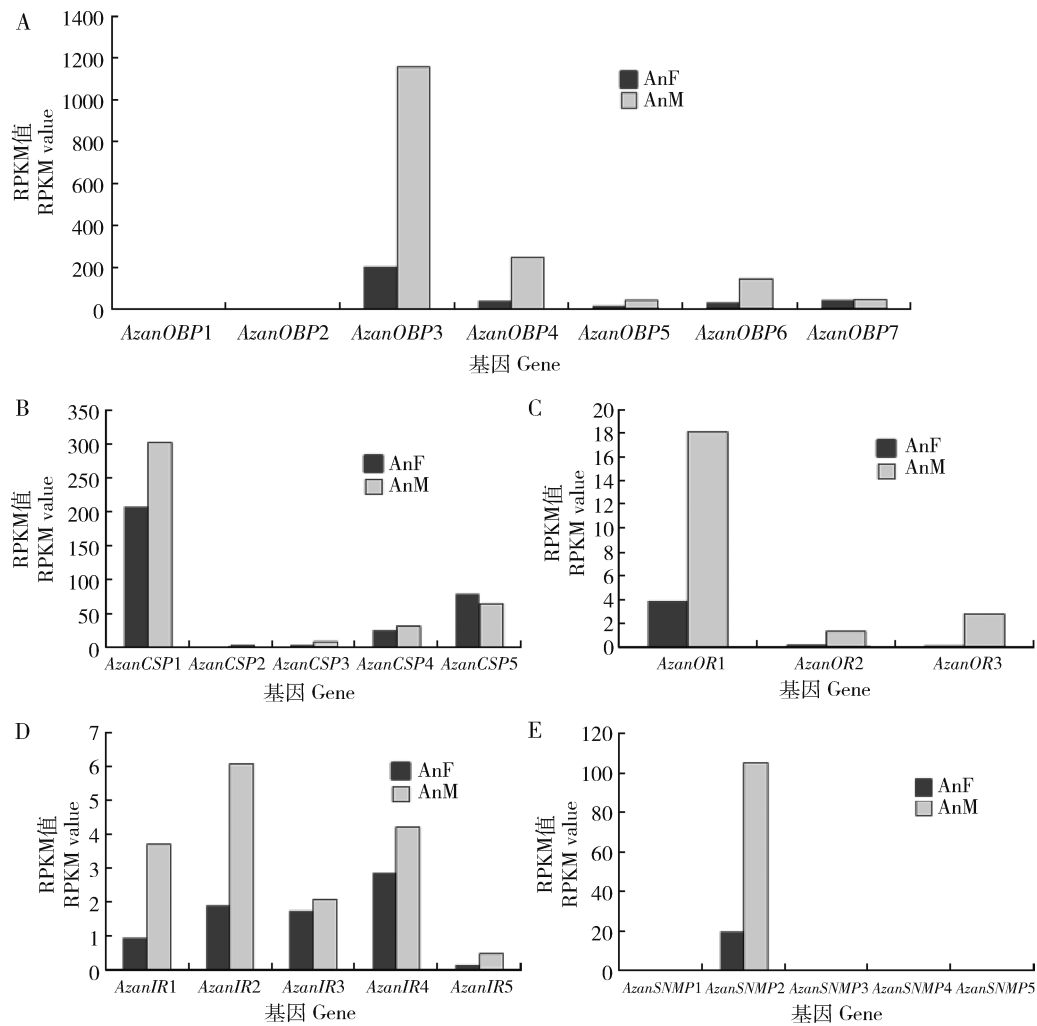


图 8 花椒窄吉丁雌雄成虫触角转录组中嗅觉相关基因的 RPKM 值

Fig. 8 RPKM values of olfaction-related genes in the antenna of female and male adults of *Agrilus zanthoxylum*

A: *AzanOBP*; B: *AzanCSP*; C: *AzanOR*; D: *AzanIR*; E: *AzanSNMP*. AnF: 雌成虫触角 Antenna of female adult; AnM: 雄成虫触角 Antenna of male adult.

A), 与前期的研究结果( 巩雪芳等, 2020) 不一致, 主要是因为本研究对象是花椒窄吉丁触角( 不包含头部), 而前期目的基因(*AzanOBP3*) 在触角中的表达研究中的研究对象是花椒窄吉丁头部( 包含触角), 且根据系统发育分析发现 *AzanOBP3* 与鞘翅目昆虫的性信息素结合蛋白聚类到同一分支, 初步猜测并推断其很可能是与花椒窄吉丁性信息素相关的气味结合蛋白( 巩雪芳等, 2020), 所以在雌雄成虫触角中的表达量差异是显著的, 在雌雄成虫头部的表达量差异是不显著的。

筛选到 7 个候选 OBP 基因, 相比于其他鞘翅目昆虫的触角转录组研究, 本研究所获得的嗅觉基因数量较偏少, 除了受 NCBI 基因数据库( <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中参考序列的数量的影响外, 还可能是因为化学感受基因中的气味结合蛋白和化

学感受蛋白两个家族进化速率较高, 这些基因进化很可能与识别特定植物化合物有关, 本研究中的研究对象花椒窄吉丁为单食性昆虫, 目前发现寄主植物只有花椒一种, 这可能造成其 OBP 和 CSP 基因不如其他昆虫的数量多。发现花椒窄吉丁 OBP 并非都是典型的 OBP( 含有 6 个保守的半胱氨酸)( 巩雪芳等, 2019), 这 7 个 OBP 基因中, 只有 5 个 OBP 基因具有全长开放阅读框; *AzanOBP1*, *AzanOBP2*, *AzanOBP3*, *AzanOBP4* 和 *AzanOBP5* 的编码蛋白具有 6 个保守的半胱氨酸位点, 符合气味结合蛋白的特征( Cys-X15-39-Cys-X3-Cys-X21-44-Cys-X7-12-Cys-X8-Cys, X 代表任意一种氨基酸), 为典型的 OBP; *AzanOBP6* 的编码蛋白序列中总共有 10 个半胱氨酸位点, 是非典型的气味结合蛋白( atypical OBPs); *AzanOBP7* 的编码蛋白具有 4 个保守的半胱

氨酸位点,初步鉴定为 DimerOBP 类。

利用 RPKM 值对基因表达量的评估结果表明(图 8),*AzanOBP1* 和 *AzanOBP2* 在雌成虫触角中不表达(RPKM = 0),在雄成虫触角中微量表达;*AzanOBP3* 在雄成虫触角中高丰度表达(RPKM > 1 000),在雌成虫触角中中量表达(RPKM = 205.25),推测其在触角中高丰度表达的 OBPs 功能与雄成虫识别同类异性释放的信息素或寄主植物释放的挥发物有关。

本研究首次构建了花椒蛀干害虫花椒窄吉丁的雌雄成虫触角转录组数据库,并成功筛选得到了部分嗅觉相关基因,为将来利用嗅觉靶标无公害防治农林害虫提供了重要分子信息;基于 KEGG 数据库把从已经完整测序的花椒窄吉丁触角转录组中得到的基因目录与更高级别的细胞、物种和生态系统水平的系统功能关联起来。研究结果为鞘翅目其他近缘物种昆虫的触角转录组的研究提供了丰富的转录本基础数据信息,对鞘翅目吉丁科非模式昆虫的研究有重要的推动意义。

参考文献 (References)

Angeli S, Ceron F, Scaloni A, Monti M, Monteforti G, Minnocci A, Petacchi R, Pelosi P, 1999. Purification, structural characterization, cloning and immunocytochemical localization of chemoreception proteins from *Schistocerca gregaria*. *Eur. J. Biochem.*, 262(3): 745 – 754.

Brito NF, Moreira MF, Melo AC, 2016. A look inside odorant-binding proteins in insect chemoreception. *J. Insect Physiol.*, 95(12): 51 – 65.

Dang GG, Guo JC, Sun DC, Zhuang LJ, 2017. Risk analysis of damage caused by *Agrilus zanthoxylumi* in Weinan City. *Prot. For. Sci. Technol.*, (4): 59 – 61. [党国刚, 郭军成, 孙杜闯, 庄丽娟, 2017. 渭南市花椒窄吉丁虫危害风险分析. 防护林科技, (4): 59 – 61]

Du P, 2012. A study on the occurrence and control of *Agrilus zanthoxylumi*. *J. Green Sci. Technol.*, (8): 57 – 58. [杜平, 2012. 花椒吉丁虫的发生与防治研究. 绿色科技, (8): 57 – 58]

Gong XF, Xie SA, Yang P, Hu HY, Guo L, Che XR, Chen D, Wang YL, Lv SJ, 2019. Preliminary screening of differentially expressed genes of female and male antenna of *Agrilus zanthoxylumi*. *J. Agric. Biotechnol.*, 27(7): 1233 – 1245. [巩雪芳, 谢寿安, 杨平, 胡洪焰, 郭莉, 车显荣, 陈迪, 王延来, 吕淑杰, 2019. 花椒窄吉丁雌、雄成虫触角差异表达基因的初步筛选. 农业生物技术学报, 27(7): 1233 – 1245]

Gong XF, Yang P, Wang YL, Guo L, Chen D, Xie SA, Lü SJ, 2020. Cloning, prokaryotic expression and tissue expression profiling of odorant binding protein gene *AzanOBP3* from *Agrilus zanthoxylumi*

(Coleoptera: Buprestidae). *Acta Entomol. Sin.*, 63(4): 390 – 400. [巩雪芳, 杨平, 王延来, 郭莉, 陈迪, 谢寿安, 吕淑杰, 2020. 花椒窄吉丁气味结合蛋白基因 *AzanOBP3* 的克隆、原核表达及组织表达谱分析. 昆虫学报, 63(4): 390 – 400]

Jiao H, 2011. Integrated control of *Agrilus zanthoxylumi*. *Agric. Technol. Serv.*, 28(3): 283. [焦浩, 2011. 花椒窄吉丁虫的综合防治. 农技服务, 28(3): 283]

Kang KG, Wang YP, Qiang L, Shi HQ, Chen H, 2007. A study on chemical control test of *Agrilus zanthoxylumi* Hou and Feng. *J. Northwest For. Univ.*, 22(6): 105 – 107. [康克功, 王永平, 强磊, 石和芹, 陈辉, 2007. 花椒窄吉丁化学防治研究. 西北林学院学报, 22(6): 105 – 107]

Li H, 2013. Prevention and control of *Agrilus zanthoxylumi* in spring. *Pestic. Market Inform.*, (12): 45. [李辉, 2013. 春季防治花椒窄吉丁虫. 农药市场信息, (12): 45]

Li ML, Li ZM, Jiao AY, 1990. Spatial distribution pattern and damage character of prickly ash stem girdler. *J. Northwest. Coll. For.*, 5(1): 34 – 38. [李孟楼, 李宗明, 焦爱叶, 1990. 花椒窄吉丁的危害规律及其分布型. 西北林学院学报, 5(1): 34 – 38]

Liu SP, Xie SA, Yuan LF, Cheng HG, 2016. Effects of *Agrilus zanthoxylumi* infection on the volatile constituents of *Zanthoxylum bungeanum*. *J. Northwest For. Univ.*, 31(5): 246 – 254. [刘绥鹏, 谢寿安, 袁丽芳, 成宏刚, 2016. 花椒窄吉丁的入侵对花椒挥发物成分的影响. 西北林学院学报, 31(5): 246 – 254]

Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B, 2008. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat. Methods*, 5(7): 621 – 628.

Quan LJ, 2016. Occurrence and control measures of *Agrilus zanthoxylumi*. *Shaanxi J. Agric. Sci.*, 62(12): 116. [权丽君, 2016. 花椒窄吉丁的发生及其防治措施. 陕西农业科学, 62(12): 116]

Wang GR, Guo YY, Wu KM, 2002. Observation on the ultrastructures of antennal sensilla in *Helicoverpa armigera*. *Sci. Agric. Sin.*, 35(12): 1479 – 1482. [王桂荣, 郭予元, 吴孔明, 2002. 棉铃虫触角感器的超微结构观察. 中国农业科学, 35(12): 1479 – 1482]

Wang Y, Li RN, Liu XT, Wang N, 2012. The occurrence and control of *Agrilus zanthoxylumi* in Hancheng. *Shaanxi For. Sci. Technol.*, (1): 76 – 77. [王燕, 李仁娜, 刘雪涛, 王娜, 2012. 韩城花椒窄吉丁虫的发生及防治. 陕西林业科技, (1): 76 – 77]

Wu H, 2006. Bionomics and control of *Agrilus zanthoxylumi*. *Chin. Bull. Entomol.*, 43(2): 236 – 239. [吴海, 2006. 花椒窄吉丁的生物学特性及防治. 昆虫知识, 43(2): 236 – 239]

Xiu WM, Dong SL, Wang YC, 2005. Pheromone binding proteins in insects with emphasis on their molecular transport and physiological functions. *Acta Entomol. Sin.*, 48(5): 788 – 784. [修伟明, 董双林, 王荫长, 2005. 昆虫信息素结合蛋白及其分子运输机制和生理功能研究进展. 昆虫学报, 48(5): 778 – 784]

Xue YZ, 1989. Prevention and control technology of *Agrilus zanthoxylumi*. *Shanxi Fruits*, (1): 33 – 34. [薛耀宗, 1989. 花椒窄吉丁虫防治技术. 山西果树, (1): 33 – 34]

Yang G, Winberg G, Ren H, Zhang S, 2011. Expression, purification

and functional analysis of an odorant binding protein AaegOBP22 from *Aedes aegypti*. *Protein Exp. Purif.*, 75(2): 165 – 171.

Yang HB, Hu ZJ, Li DX, Zhu PH, Dong JF, 2018. Analysis of the antennal transcriptome and olfactory-related genes of the sycamore lace bug ( *Corythucha ciliata* ). *J. Agric. Biotechnol.*, 26(12): 2109 – 2120. [ 杨海博, 胡镇杰, 李定旭, 朱品红, 董钧锋, 2018. 悬铃木方翅网蝽触角转录组及嗅觉相关基因分析. 农业生物技术学报, 26(12): 2109 – 2120 ]

You L, Wang GL, Wei HY, 2012. Advances in neuron transferring pathways in insects’ olfactory signals. *Biol. Dis. Sci.*, 35(1): 7 – 11. [ 游灵, 王广利, 魏洪义, 2012. 昆虫嗅觉信号神经传递途径的研究进展. 生物灾害科学, 35(1): 7 – 11 ]

Yuan LF, Xie SA, Liu SP, Lv SJ, Guo XR, Song XB, 2017. Electroantennogram and behavioural responses of *Agrilus zanthoxylumi* to volatiles from *Zanthoxylum bungeanum*. *J. Northwest A&F Univ. (Nat. Sci. Ed.)*, 45(2): 111 – 120. [ 袁丽芳, 谢寿安, 刘绥鹏, 吕淑杰, 郭新荣, 宋晓斌, 2017. 花椒窄吉丁对寄主挥发物的触角电位及行为反应. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 45(2): 111 – 120 ]

Zhan WH, Zhang SF, Geng HW, Wang YY, Guo K, Chen J, 2018. Research progress on olfactory recognition proteins of longhorn beetle. *J. Henan Agric. Sci.*, 47(3): 1 – 6. [ 詹文会, 张苏芳, 耿红卫, 王野影, 郭昆, 陈君, 2018. 天牛嗅觉感受相关蛋白研究进展. 河南农业科学, 47(3): 1 – 6 ]

Zhang J, Wang B, Dong SL, Cao DP, Dong JF, Walker WB, Liu Y, Wang GR, 2015. Antennal transcriptome analysis and comparison of chemosensory gene families in two closely related Noctuidae moths, *Helicoverpa armigera* and *H. assulta*. *PLoS ONE*, 10(2): 0117054.

Zheng HX, Zhang YW, Zhang XH, Yang MH, 2018. Analysis of the antennal transcriptome and olfaction-related genes of *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae). *Acta Entomol. Sin.*, 61(2): 168 – 177. [ 郑海霞, 张耀文, 张仙红, 杨美红, 2018. 绿豆象触角转录组及嗅觉相关基因的分析. 昆虫学报, 61(2): 168 – 177 ]

Zhu J, Arena S, Spinelli S, Liu DZ, Zhang GQ, Wei RP, Cambillauc C, Scaloni A, Wang GR, Pelosi P, 2017. Reverse chemical ecology: olfactory proteins from the giant panda and their interactions with putative pheromones and bamboo volatiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 114(46): 201711437.

(责任编辑: 马丽萍)